

III

INTRODUCCION DE GENES EXTRAESPECIFICOS EN EL TRIGO

por

Francisco García Olmedo

Angeles Delibes

Rosa Sánchez-Monge

(DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA. E. T. S. INGENIEROS AGRONOMOS.
UNIVERSIDAD POLITECNICA DE MADRID)

La introducción de caracteres extragenéricos o extraespecíficos en plantas cultivadas tiene interés teórico y una reconocida importancia práctica (ver p.ej. ref.1).

En el caso de los trigos cultivados, pueden actuar como donadores de genes que controlan caracteres de calidad, de resistencia a agentes patógenos, etc., especies afines de los géneros *Secale*, *Agropyron* y *Aegilops*.

Los métodos empleados para la introducción de estos caracteres son variados y dependen de la afinidad existente entre la especie donadora y la receptora.

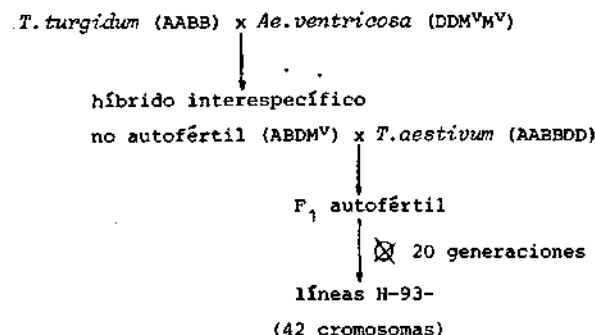
El proceso de transferencia requiere, en primer lugar, salvar los impedimentos que se presentan para el acceso del material genético extraño al núcleo receptor y, posteriormente, lograr la integración estable de dicho material.

El objetivo primordial del presente trabajo ha sido estudiar, por una combinación de métodos bioquímicos y citogenéticos, la transferencia génica extraespecífica en un cruzamiento doble (*Triticum turgidum* AABB x *Aegilops ventricosa* DDM^VVM^V) x *T.aestivum* AABBDD. El interés de este estudio estriba en las posibles ventajas que dicho tipo de cruzamiento puede presentar para la transferencia e integración estable de material genético del genomio MV de *Ae. ventricosa* en trigo hexaploide, frente a posibles métodos alternativos, tales como la hibridación directa o la obtención de un anfídiploide puente.

Ae.ventricosa es una especie alotetraploide, de constitución genómica DDM^VVM^V, que posee caracteres interesantes, tales como resistencia al mal de pie, causado por el hongo *Cercospora herpotrichoides*, y al mosquito del trigo *Phytophaga destructor*. Su potencial como especie donadora de caracteres útiles ha sido sólo parcialmente explotado, habiéndose centrado los esfuerzos en la transferencia de genes del genomio D responsables de resistencia al mal de pie (ver refs.2,3).

MATERIAL Y METODOS

Material biológico. Se han utilizado 70 líneas (H-93-1 a 70) obtenidas del modo siguiente:



Dichas líneas, el material parental y muestras de las especies *Ae. squarrosa* (DD) *Ae. comosa* (MM) y *Ae. uniaristata* (M^{MM}M^{MM}) fueron donadas por M. Alonso Peña (Cuenca). Se obtuvieron híbridos entre líneas H-93- y el parental *T. aestivum* (H-10-15) (fig. 1).

Métodos bioquímicos. Se ha estudiado la distribución de 48 marcadores bioquímicos cuyo control genético y métodos de ensayo han sido descritos en las referencias que se citan entre paréntesis: proteínas NGE (4-8), extracto urea 2M (9), gliadinas (9), purotióninas (10-12), ésteres de esteroles (13-17), isoenzimas de peroxidasa (9,18), isoenzimas de alcohol deshidrogenasa (19), isoenzimas de fosfatasa alcalina (9,19) y esterasas (9,20).

Los análisis de nitrógeno y de aminoácidos, la determinación de la calidad tecnológica y el fraccionamiento de proteínas se realizaron por métodos standard.

Métodos citológicos. Se realizaron recuentos cromosómicos en meristemos radiculares de las líneas H-93- y se estudió la meiosis de dichas líneas y de sus híbridos con el parental *T. aestivum*. Las tinciones se llevaron a cabo por el método de Feulgen (figuras 2 y 3).

Determinaciones de resistencia a enfermedades. Fueron realizadas por los Dres. F. Dosba y G. Doussinault (CNRS, Rennes, Francia) según métodos descritos por ellos (3).

RESULTADOS Y DISCUSION

En la figura 4 se representan los posibles casos de localización cromosómica de marcadores genéticos en el material parental y se consignan las frecuencias esperadas en la descendencia H-93- para los marcadores correspondientes a cada uno de los casos: a) marcador asociado a los genomas A, B o D de una sola de las especies parentales; b) marcador presente en los genomas A, B o D de dos de las especies parentales, pero en posición distinta; c) caso análogo al a, salvo que el marcador está además presente en el genomio MV; d) marcador en posiciones homólogas de los genomas A, B o D de dos de las especies parentales; e) marcador asociado sólo al genomio MV; f) caso análogo al d, salvo que el marcador está también presente en MV.

Sólo la presencia de marcadores correspondientes al caso e demuestra inequívocamente la transferencia de material genético del genomio MV, ya que los casos d y f pueden explicarse también por delección y el caso c no resulta útil cuando, como en nuestro estudio, la muestra de la descendencia no es aleatoria.

Se ha estudiado la distribución de 48 marcadores bioquímicos en las especies consignadas en la figura 4, con el objeto de realizar tentativamente su asignación a los distintos genomas, y en las líneas H-93-.

Los datos correspondientes a marcadores de los genomas A y B de *T. turgidum* y *T. aestivum* son compatibles con que la mayor parte de las ovocélulas del híbrido no autofértil ABDM^V, recuperadas por fertilización con polen de *T. aestivum*, llevaran los genomas A y B completos. Los 10 marcadores del tipo d y el marcador del tipo f asignados a estos genomas aparecen con la frecuencia esperada del 100% en las líneas H-93-, mientras que los 5 marcadores tipo a, asociados a los parentales *Triticum*, aparecen con frecuencias comprendidas en el intervalo 32-72%, que son compatibles con la esperada del 50%, por no representar las líneas H-93- una muestra aleatoria de la descendencia.

Respecto al genomio D, 3 de 8 marcadores tipos d o f aparecen en las líneas H-93- con frecuencias próximas pero inferiores a la esperada del 100%, lo que, según se indicó, puede ser debido a transferencia no homóloga o a delección. Los marcadores tipo a o b aparecen con frecuencias compatibles con las esperadas.

Se encontraron 6 marcadores bioquímicos presentes en *Ae. ventricosa* (DDMV^{MV}), *Ae. comosa* (MM) y *Ae. uniaristata* (M^{MM}M^{MM}) y ausentes en *T. aestivum*

(AABBDD), *T. turgidum* (AABB) y *Ae. squarrosa* (DD), que, por tanto, son presuntos marcadores del genotipo MV. La distribución de estos marcadores en las líneas H-93- resultó ser la siguiente: isoenzima de fosfatasa alcalina (Aph-3), presente en las líneas H-93-1 y -33; isoenzima de peroxidasa (Px_m), ausente en las líneas H-93-; isoenzima de alcohol deshidrogenasa (Adh_u), presente en H-93-33; componente del extracto urea 2M (U-1), presente en las líneas H-93-1, -8, y -35; (U-3), ausente; componente(s) NGE-17^{Ae1,2,3}, presente(s) en 22 de las 70 líneas H-93-. La alta frecuencia de transmisión de este último marcador hace suponer que la localización del gen o genes que lo controlan correspondía al genotipo D en el momento de realizar el cruzamiento objeto de nuestro estudio. Es decir, su translocación debió tener lugar del genotipo MV al D en el *Ae. ventricosa* parental. Hay que señalar que en todas las líneas portadoras de este marcador está ausente el marcador NGE-17, controlado por el cromosoma 4D de *T. aestivum* cv. Chinese Spring.

Se ha determinado la resistencia al oidio (*Erysiphe graminis*; Pm), que es un carácter monogénico, en el material parental y en las líneas H-93-. Los resultados, que se resumen en la figura 4, indican que dicho factor de resistencia se transmite como controlado por el genotipo MV.

Con objeto de estudiar la forma de integración del material genético transferido, se estudió la meiosis de las líneas H-93-1, -8, -33 y -35 y la de sus híbridos por el parental *T. aestivum*. También se incluyeron en el estudio las líneas H-93-10 y -51, en las que están ausentes los marcadores NGE-3 y -4. La meiosis de todas las líneas, excepto la H-93-33, resultó ser regular, no difiriendo significativamente de la del parental *T. aestivum* más que en el número de bivalentes abiertos. La línea H-93-33 presentó mayor irregularidad en las tres fases estudiadas: metafase I, anafase I y tétradas. El estudio meiótico de los híbridos revela la formación de 2-4 univalentes, según la línea H-93- hibridada, lo que indica, según los casos, 1 ó 2 cromosomas extraños. Esto supone una acotación por alto del número de cromosomas del genotipo MV transferidos, por dos razones: i) por la incompleta homología de los genotipos D de *Ae. ventricosa* y de *T. aestivum* y ii) porque en la práctica puede bastar que existan segmentos cromosómicos terminales translocados para que no tenga lugar apareamiento meiótico.

De las observaciones mitóticas en meristemas radiculares se había concluido previamente que todas las líneas H-93-, con la posible excepción de H-93-1, poseen 42 cromosomas. La línea H-93-1 presentaba mosaicos de células

con números cromosómicos múltiplos de 7. Como se ha indicado, la meiosis de esta línea es, en cambio, regular y pone de manifiesto que posee también 42 cromosomas.

En el cuadro 1 se resumen los datos bioquímicos y citológicos correspondientes a estas líneas. Dichos datos indican que ha tenido lugar transferencia no homóloga del genotipo MV de *Aegilops ventricosa* a trigo hexaploide, por sustitución cromosómica y por recombinación. Esto último se infiere de la distribución de los marcadores Aph-3, U-1 y Pm en confrontación con los números máximos de cromosomas MV presentes en las líneas que se consignan en el cuadro.

CUADRO 1. DISTRIBUCION DE MARCADORES GENETICOS Y NUMERO MAXIMO DE CROMOSOMAS MV EN LINEAS H-93- PROCEDENTES DE UN CRUZAMIENTO [*T. turgidum* x *Ae. ventricosa*] x *T. aestivum*.

Genotipos	Marcadores*	Líneas H-93-					
		1	8	10	33	35	51
MV	Aph-3	+	-	-	+	-	-
	U-1	+	+	-	-	+	-
	Pm	-	+	-	+	+	-
DV/D ^a	Adh-u	-	-	-	+	-	-
	NGE-3 y -4	-	-	-	+	+	-
	NGE-11	-	+	+	+	+	+
DV	NGE-17 ^{Ae1,2,3}	+	+	+	+	-	+
	Es-1 y -2	+	+	+	-	-	-
D ^a	NGE-17	-	-	-	-	+	-
	Adh-δ	+	-	+	-	-	+
	Ath-1 y -2	-	+	-	-	+	-
Número máximo de cromosomas MV		1	2	1	2	1	1

* Símbolos explicados en el texto, excepto Ath-1 y -2 < > Athinas 1 y 2

Se ha investigado también si las modificaciones en las características bioquímicas del endospermo de trigo, resultantes de la transferencia génica, afectan a su calidad nutritiva y tecnológica. Los análisis de proteínas y de aminoácidos, así como los ensayos reológicos realizados, indican que, si bien algunas líneas presentan propiedades interesantes, no hay ninguna línea con

características excepcionales.

Otro aspecto de interés abordado en nuestro estudio ha sido el referente a la transferencia de resistencia al ataque por *Cercospora herpotrichoides*. El 47% de las líneas presentan a un nivel de resistencia que no difiere significativamente del correspondiente al parental *Ae. ventricosa*. Los intentos de Kimber (2) y de Dosba y Doussinault (3) no dieron por resultado líneas de trigo con resistencia equivalente a la de *Ae. ventricosa*, por lo que se especuló que dicha resistencia estaba sujeta a un control poligénico y que al menos algunos de los genes deberían estar localizados en el genoma MV. Los resultados presentes no soportan ninguna de las dos hipótesis.

El doble cruzamiento interespecífico objeto del presente estudio es extensible, como método de transferencia de variabilidad genética extraespecífica, a otras especies del mismo complejo *Aegilops-Triticum* y, posiblemente, a otros complejos alopoloides. Concretamente, se ha cubierto la primera etapa del cruzamiento para *Ae. crassa* (DDM^{CR}MC^{CR}) y *Ae. cylindrica* (DDCC) y se ha obtenido el híbrido doble correspondiente a *Ae. triuncialis* (CCC^{CU}CU).

Finalmente cabe señalar que no es imposible que se puedan dar de forma natural cruzamientos del tipo del estudiado, ya que, por ejemplo, está bien establecido que el cruzamiento [*T. turgidum* x *Ae. ventricosa*], primera etapa del que hemos estudiado, ocurre espontáneamente en Argelia.

RECONOCIMIENTO. Los autores reconocen la colaboración de Concepción Rodilla en el estudio citológico y de Pilar Gil en los análisis de proteínas.

REFERENCIAS

1. Lacadena, J.R. (1976) *Genética*, 2ª Ed. AGESA, Madrid.
2. Kimber, G. (1967) *J. Agric. Sci. Camb.* 68, 373-376.
3. Dosba, F. & Doussinault, G. (1973) In *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.* Columbia, Mo. (ed. E.R.Sears & L.M.Sears) pp.409-414.
4. García-Olmedo, F. & Carbonero, P. (1970) *Phytochemistry*, 9, 1495-1497.
5. Aragoncillo, C., Rodríguez-Loperena, M.A., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1975) *Anal. Biochem.*, 63, 603-606.
6. Rodríguez-Loperena, M.A., Aragoncillo, C., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1975) *Phytochemistry*, 14, 1219-1223.
7. Aragoncillo, C., Rodríguez-Loperena, M.A., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1975) *Theoret. Appl. Genetics*, 45, 322-326.
8. Rodríguez-Loperena, M.A., Aragoncillo, C., Torres, J.V. Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1975) *Plant Sci. Lett.*, 5, 387-393.
9. Delibes, A. & García-Olmedo, F. (1973) In *Proc. 4th Int. Wheat Genet. Symp.*, Columbia, Mo. (ed. E.R.Sears & L.M.S.Sears) pp. 161-166.
10. Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1969) *Experientia*, 25, 1110.
11. Fernández de Caleyá, R., Hernández-Lucas, C., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1976) *Genetics*, 83, 687-699.
12. Hernández-Lucas, C., Fernández de Caleyá, R., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1977) *Genetics* (en prensa).
13. García-Olmedo, F. (1968) *Nature*, 220, 1144-1145.
14. Torres, J.V. & García-Olmedo, F. (1974) *Plant Sci. Lett.*, 3, 213-217.
15. Torres, J.V. & García-Olmedo, F. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, 409, 367-375.
16. Carbonero, P., Torres, J.V. & García-Olmedo, F. (1975) *FEBS Lett.*, 56, 198-201.
17. Torres, J.V., Carbonero, P. & García-Olmedo, F. (1976) *Phytochemistry*, 15, 677-680.
18. MacDonald, T. & Smith, H.H. (1972) *Genetics*, 72, 77-86.
19. Hart, G.E. (1970) *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 66, 1136-1141.
20. Nakai, Y. & Tsnewaki, K. (1971) *Jap. J. Genet.*, 46, 321-336.